

**Quantitative Untersuchungen zum Nachweis von
Antigen-Antikörpern-Reaktionen mit der passiven
cutanen Anaphylaxie und ihre Beeinflussung mit
Histamin- und Serotoninhemmern.**

Hermann J. Kapp

=

1963
=

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik
zu Frankfurt am Main
Direktor: Prof. Dr. med. F. Hoff

Quantitative Untersuchungen zum Nachweis von
Antigen - Antikörpern - Reaktionen mit der
passiven cutanen Anaphylaxie und ihre Beein-
flussung mit Histamin- und Serotoninhemmern.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Hermann J. Kapp aus Essen
im August 1962



Dekan: Prof.Dr. Krücke

Referent: Prof.Dr. Pfeiffer

Korreferent: Prof.Dr. Taubmann

Mündliche Prüfung: 21. Juni 1963

Gliederung

I. Einleitung

- 1) Historischer Rückblick
- 2) Eigenschaften von Antigenen
- 3) Eigenschaften von Antikörpern
- 4) Der Nachweis von Antigen - Antikörper - Reaktionen
- 5) Die Bedeutung von Histamin und Serotonin bei der Antigen - Antikörper - Reaktion
- 6) Fragestellung

II. Methodik

- 1) Die passive cutane Anaphylaxie (Ovary)
- 2) Herstellung der Antisera
- 3) Die Immunoelktrophorese

III. Ergebnisse der Untersuchungen

- 1) Unspezifische Reaktion
- 2) Untersuchungen mit dem System Kaninchen - anti - Menschen - Albuminserum und Humanserum bzw. Humanalbumin
- 3) Untersuchungen mit dem System Kaninchen - anti - Menschen - α - β - Globulinserum und Humanserum und Humanalbumin
- 4) Untersuchungen mit dem System Kaninchen - anti - Menschen - γ - Globulinserum und Humanserum bzw. Humanalbumin
- 5) Untersuchungen des Einflusses von Luvistin und Periaktin auf die passive cutane Anaphylaxie - Reaktion
- 6) Untersuchungen des Einflusses von Lysergsäurediäthylamid auf die passive cutane Anaphylaxie - Reaktion

IV. Besprechung der Ergebnisse

V. Zusammenfassung

I. Einleitung

- 1) Um die Jahrhundertwende untersuchte Richet die wirksamen Substanzen der Tentakeln von Aktinien. Durch Extraktion mit Glycerin gewann er eine hochtoxische Flüssigkeit. Um die Toxizität dieses Extraktes quantitativ zu bestimmen, injizierte er die Flüssigkeit Hunden. Ein Teil seiner Hunde kam sofort, ein anderer Teil jedoch erst nach einigen Tagen zu Tode. Einige der Hunde blieben aber am Leben. Verabreichte er diesen Hunden nochmals parenteral den Extrakt, so zeigte es sich, dass die Tiere jetzt selbst auf sehr geringe Mengen des Extraktes ausserordentlich empfindlich reagierten und innerhalb kurzer Zeit unter akuten Erscheinungen starben. Richet machte jedoch bei diesen Experimenten die Beobachtung, dass zwischen der ersten und der zweiten Injektion ein gewisses Zeitintervall verstreichen musste, damit die Tiere in der besonders empfindlichen Weise reagierten. War der Abstand zwischen den beiden Injektionen zu kurz, so verhielten sich die vorbehandelten Hunde wie unvorbehandelte Tiere.

Als Richet im Jahre 1902 die Ergebnisse seiner Experimente veröffentlichte, gab er dem Phänomen dieser gesteigerten Empfindlichkeit den Namen "Anaphylaxie". Er wollte damit ausdrücken, dass "manche Stoffe die merkwürdige Eigenschaft besitzen, die Empfindlichkeit des Organismus gegen ihre Wirkung zu steigern statt sie zu vermindern".

Arthus konnte im Jahre 1903 die Versuchsergebnisse von Richet an Kaninchen reproduzieren. Er verwendete an Stelle hochtoxischer Substanzen das für das Kaninchen ungiftige Pferdeserum. Desgleichen gelang ihm die anaphylaktische Reaktion, wenn er Kuhmilch parenteral injizierte. Nur war es notwendig, dass er bei der Erfolgsinjektion, das heisst bei der Injektion, mit der er die Anaphylaxie hervorrufen wollte, immer die gleiche Substanz verwendete, die er bei der Erstinjektion benutzt hatte.

Diese Ergebnisse liessen sich jedoch nicht mit der Definition vereinbaren, die Richet für die Anaphylaxie gegeben hatte; denn die Giftigkeit der Substanz, die von Richet so betont wurde, war nicht notwendig, um eine anaphylaktische Reaktion hervorzurufen. Arthus konnte ja mit Pferdeserum bei Kaninchen eine Anaphylaxie erzeugen, obwohl das Serum für die Tiere ungiftig ist.

Nach den Experimenten von Arthus war es offenkundig, dass die Anaphylaxie durch artfremdes Eiweiss hervorgerufen wurde. Seit längerer Zeit war schon bekannt, dass artfremde Sera Antikörper erzeugen. Man kam daher auf den Gedanken, eine passive Anaphylaxie zu erzeugen, das heisst Serum von Tieren, die vorher mit artfremdem Eiweiss behandelt worden waren, auf unvorbehandelte Tiere zu übertragen und durch nachfolgende Injektion des betreffenden artfremden Eiweisses einen anaphylaktischen Zustand zu erzeugen. Dieses Problem wurde im Jahre 1907 von verschiedenen Forschern systematisch untersucht, so von M. Nicolle, R. Otto, U. Friedemann und F.P. Gay und E.E. Southard. Der Schock eines passiv präparierten Tieres unterschied sich weder qualitativ noch quantitativ vom Schock eines aktiv vorbehandelten Tieres. Bei dem passiv übertragenen Agens musste es sich also um einen Antikörper handeln. Dies ergab sich aus der Tatsache, dass es einem Antigen seine Entstehung verdankte, dass es spezifisch mit dem Antigen reagierte und dass es im Serum enthalten war (Doerr). Aus diesen Befunden ging hervor, dass die anaphylaktische Reaktion auf einer Antigen - Antikörper - Reaktion beruht.

Was versteht man nun unter Antigen, unter Antikörpern und was liegt einer Antigen - Antikörper - Reaktion zugrunde?

- 2) Antigene sind Stoffe, die die Bildung von Antikörpern hervorrufen und sich mit diesen spezifisch vereinigen können. Die frühere Annahme, dass eine Substanz mit antigenen Eigenschaften ein grosses Molekulargewicht besitzen, eine Eiweissnatur haben und für den Organismus fremdartig sein müsse, konnte durch neuere Untersuchungen zum Teil widerlegt werden. Die grosse Molekularmasse scheint zwar

die antigenen Eigenschaften einer Substanz zu begünstigen. Es gibt jedoch zahlreiche Beispiele von Sensibilisierungen gegen Stoffe mit sehr kleiner Molekularmasse (Grabar). Auch muss eine Substanz, die antigenen Charakter besitzt, nicht unbedingt ein Eiweisskörper sein. So sind die Endotoxine der gramnegativen Bakterien, mit denen sich Antikörper erzeugen lassen, vor allem aus Glucolipiden und nicht aus Proteinen zusammengesetzt (Grabar). Auch die dritte Grundeigenschaft der Antigene, der exogene Ursprung, ist nicht absolut notwendig. Verschiedentlich konnte gezeigt werden, dass es eine Antikörperbildung gegen Stoffe desselben Organismus gibt. So berichten Ovary und Mitarbeiter über Autoantikörperbildung bei Patienten mit chronischer Thyreoiditis gegen homologes Schilddrüsengewebe. Desgleichen konnten sie bei Kaninchen und Meerschweinchen Autoantikörper gegen homologes Schilddrüsengewebe, das den Tieren unter bestimmten Versuchsbedingungen injiziert worden war, nachweisen. Die Autoantikörper reagierten spezifisch mit ihrem korrespondierenden Antigen und gaben keine Kreuzreaktionen mit dem Thyreoideaextrakt einer anderen Spezies.

So gilt heute die Ansicht, dass ein grosses Molekül, Eiweissnatur und fehlende Verwandtschaft mit dem geimpften Organismus einen Stoff mit grosser Wahrscheinlichkeit zum Antigen werden lässt, dass aber auch kleinmolekulare Substanzen und hochpolymerisierte Polysaccharide zu Antigenen werden können (Grabar). Unter Umständen induzieren sogar Substanzen endogenen Ursprungs die Bildung von Antikörpern, sogenannten Autoantikörpern.

- 3) Antikörper sind chemisch gesehen Holoproteine, das heisst sie setzen sich aus Aminosäureketten zusammen und verfügen über keine prosthetischen Gruppen. Elektrophoretisch weist die Mehrzahl der Antikörper die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die Gammaglobuline auf. Bisher ist es noch nicht möglich gewesen, sie auf Grund ihrer physikalischen, chemischen und antigenen Eigenschaften von den analogen Globulinen ~~sicher~~ zu unterscheiden (Grabar). Die wesentlichste

Eigenschaft der Antikörper ist ihre spezifische Reaktion mit dem Antigen, das ihre Bildung veranlasst hat, die Antigen - Antikörper - Reaktion.

- 4) Zum Nachweis von Antigen - Antikörper - Reaktionen in vitro sind zahlreiche Methoden angegeben worden. Am einfachsten lässt sich der Nachweis führen, wenn unlösliche Komplexe gebildet werden. Man spricht in diesem Falle von einer Präzipitationsreaktion. Auf diesem Prinzip beruht auch die heute für die Bearbeitung zahlreicher Probleme angewandte Immunoelktrophorese. Ein anderes Verfahren beruht auf der Agglutination gröberer Partikel. Es findet dann Verwendung, wenn das Antigen unlöslich ist oder wenn der Antigen - Antikörper - Komplex nicht präzipitiert. Das Antigen wird dabei an größere Transportpartikel, z.B. Erythrozyten oder Kollodiumtröpfchen angelagert, die anschliessend durch Zusatz des Antikörpers zur Agglutination gebracht werden. Auch der Verbrauch von Komplement bei Reaktion des Antigens mit dem Antikörper sowie die Lyse von Erythrozyten kann zum Antigen - Antikörper - Nachweis herangezogen werden.

Die Erscheinungsformen der Antigen - Antikörper - Reaktion im lebenden Organismus sind sehr mannigfaltig. Sie können auf der einen Seite günstige Auswirkungen haben, die man als Schutzwirkungen zusammenfasst. Auf der anderen Seite kann eine Antigen - Antikörper Reaktion jedoch katastrophale Folgen haben, unter Umständen den Tod des betreffenden Individuums herbeiführen. Diese Wirkungen werden unter dem Begriff der pathologischen Wirkung einer Antigen - Antikörper - Reaktion zusammengefasst (Grabar). Hierzu zählen auch die anaphylaktischen Reaktionen, auf die wir anfangs bereits hingewiesen haben und im folgenden näher eingehen wollen.

Die anaphylaktische Reaktion führt zum anaphylaktischen Schock, der bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich verläuft. Die verschiedene Ausprägung der Schocks beruht auf einer unterschiedlichen Organ disposition der einzelnen Spezies, auf die Substanzen

zu reagieren, die bei einer Antigen - Antikörper - Reaktion freiwerden. Bei Menschen sind Lunge, Leber und das Gefäß-System die bevorzugten Reaktionsorgane. Histologisch zeigt sich eine hochgradige Erweiterung der Alveolen, in denen sich eine eiweissreiche Oedemflüssigkeit angesammelt hat. Die Bronchialmuskulatur ist spastisch kontrahiert. In der Leber sind die Räume zwischen den Leberzellbalken erweitert. Die einzelnen Leberzellen zeigen Wabenstruktur. Die Pfortaderäste sind vielfach thrombosiert (Hansen).

Bei den Meerschweinchen steht als Schockorgan die Lunge ganz im Vordergrund, während beim Hund die Leber das eigentliche Schockorgan ist.

Eine andere Antigen - Antikörper - Reaktion in vivo ist das Arthusphänomen. Diese Reaktion findet im aktiv immunisierten Organismus statt. Das Antigen wird nach Sensibilisierung intrakutan injiziert und reagiert hier mit dem korrespondierenden, im Blut kreisenden Antikörper.

Bei der passiven cutanen Anaphylaxie handelt es sich um eine lokale anaphylaktische Hautreaktion nach vorausgehender passiver Immunisierung. Der Antikörper kann dabei auch intrakutan und das Antigen nach einer kurzen Zeitspanne intravenös verabreicht werden. An der Hautstelle der Antigen- bzw. Antikörper - Injektion kommt es durch die Reaktion des Antigens mit dem Antikörper zur Erhöhung der Permeabilität der kleinsten Gefäße und zum lokalen Oedem. Wodurch werden die Erscheinungen bei der Antigen - Antikörper - Reaktion verursacht?

- 5) Dale und Laidlaw haben als erste auf die Ähnlichkeit von anaphylaktischem Schock und der Wirkung von Histamin hingewiesen. Systematische Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem anaphylaktischen Schock und dem Histamin wurden von Bartosch, Feldberg und Nagel durchgeführt. Sie verwendeten für ihre Versuche die isolierte, künstlich durchströmte Lunge von sensibilisierten Meer-

schweinchen, die von der Lungenarterie her mit physiologischer Salzlösung durchströmt wurde. Nach Hinzufügen des Antigens zur Durchströmungsflüssigkeit konnten sie das Auftreten einer Substanz nachweisen, welche die Wirkung von Histamin in den Verdünnungen von 1 : 2 000 000 bis 1 : 12 000 000 besitzt. Bei der Frage nach der Natur dieses Stoffes berücksichtigten sie auch die anderen biologisch wirksamen Substanzen, die in den Geweben vorkommen und als Gewebshormone zusammengefasst worden waren, wie histaminähnlich wirkende Peptone und Albumosen, Adenylphosphorsäure, Acetylcholin und Cholin. Ausser mit Histamin und den histaminähnlich wirkenden Peptonen konnten sie mit den anderen Gewebshormonen keine anaphylaktischen Reaktionen erzeugen, so dass für dieses Phänomen allein das Histamin verantwortlich zu sein schien. Lediglich die verminderte Gerinnbarkeit des Blutes war mit der Histaminwirkung nicht zu erklären. Diese Beobachtung sprach für die Wirkung von Peptonen. In neuerer Zeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der grösste Teil des Histamins in den Mastzellen deponiert wird, in denen die Synthese des Heparins abläuft (Riley und West). Wahrscheinlich ist die Base Histamin an die Säure Heparin gebunden, und die metachromatisch anfärbbaren Granula der Mastzellen stellen den Histamin-Heparin-Komplex dar (Sanyal und West). Bei der Freisetzung von Histamin wird damit auch Heparin frei. und die Koagulationsfähigkeit des Blutes herabgesetzt.

Zahlreiche andere Untersuchungen bestätigen, dass Histamin bei einer Antigen - Antikörper - Reaktion freigesetzt wird. So fanden Code bei Meerschweinchen und Dragstedt und Mitarbeiter bei Hunden einen Anstieg der Histaminkonzentration im Blut bei anaphylaktischen Reaktionen.

Schachter untersuchte Kaninchen und beobachtete bei diesen Tieren ebenfalls die Freisetzung von Histamin nach Antigen - Antikörper - Reaktionen. Serotonin, das ähnliche Wirkungen wie Histamin hat, konnte er dadurch ausschliessen, dass es ihm mit Mepyramin, einem spezifischen Antihistaminikum, gelang, die Wirkung von Kaninchen-

blut auf den Meerschweinchendarm nach einer Antigen - Antikörper - Reaktion zu hemmen. Mit reinen Histaminlösungen und Antihistaminika fand er die gleichen Reaktionshemmungen wie mit dem reaktionsaktiven Kaninchenblut. Serotonin liess sich dagegen durch Antihistaminika nicht beeinflussen. Die Untersuchungen von Schachter zeigen somit, dass die Folgen der Antigen - Antikörper - Reaktion auf die Freisetzung von Histamin zurückzuführen sind.

Die Tatsache aber, dass die Antihistaminika nicht die gleiche anti-anaphylaktische Wirkung wie Antihistaminwirkung entfalten, spricht dafür, dass wahrscheinlich das Histamin nicht allein für die Folgen einer Antigen - Antikörper - Reaktion verantwortlich ist (Mosebach). In letzter Zeit mehren sich die Hinweise dafür, dass neben Histamin auch noch andere Substanzen frei werden. Im Mittelpunkt des Interesses steht wieder das Serotonin, das von Rapport als 5 - Hydroxytryptamin erkannt wurde. Und Humphrey und Jaques konnten nachweisen, dass zusammen mit Histamin auch Serotonin in das Plasma abgegeben wird, wenn Antigene in vitro mit antikörperhaltigem Plasma und Thrombozyten inkubiert werden. Der Rattenuterus kontrahiert sich im anaphylaktischen Schock, obwohl er auf Histamin unempfindlich ist. Er reagiert aber sehr empfindlich auf Serotonin (Gaddum, Peart und Vogt). Auch reagiert die Ratte viel empfindlicher mit einem Pfortenoedem nach Serotonininjektionen als nach Histamininjektionen (Benditt und Rowley).

- 6) Bei der passiven cutanen Anaphylaxie handelt es sich, wie bereits oben erwähnt wurde, um eine lokale anaphylaktische Reaktion. In den letzten Jahren wurde diese Reaktion besonders von Ovary und Mitarbeitern, Fisher und Mitarbeitern und Rosenberg, Chandler und Fischel untersucht. Sie konnten zeigen, dass es sich um eine besonders empfindliche Reaktion handelt, mit der selbst geringste Antikörper- und Antigenmengen nachweisbar sind. Wegen ihrer hohen Empfindlichkeit eignet sie sich zur Bearbeitung vieler immunologischer Probleme und auch zum Antikörpernachweis in der Klinik bei verschiedenen Krankheitszuständen (Ovary und Witebsky). So konnten

wir mit dieser Methode z.B. bei der Insulinresistenz Antikörper gegen Insulin nachweisen (Ditschuneit, Kapp und Pfeiffer).

Bei der Verwendung verschiedener Antigen - Antikörpersysteme machten Ovary und Mitarbeiter die Beobachtung, dass sich nicht mit allen Systemen positive Ergebnisse erzielen lassen. So lässt sich mit Antisera vom Pferd gegen verschiedene Antigene keine passive cutane Anaphylaxie hervorrufen (Ovary und Bier). Man nimmt an, dass nicht alle Antikörper von den Zellen der Haut fixiert werden können. Dass auch Eigenschaften des Antigens von Bedeutung sind, zeigten Bier und Siqueira. Sie konnten mit Ziegen- und Rinder- γ -Globulin und ihrem korrespondierenden Kaninchenantiserum keine umgekehrte passive cutane Anaphylaxie hervorrufen. Sie glauben, dass die verschiedenen Antigene unterschiedlich strukturiert sind, so dass die Gewebszellen diese nicht zu fixieren imstande sind.

In der vorliegenden Arbeit soll nun untersucht werden, welchen Einfluss die Molekülgrösse des Antigens auf die passive cutane Anaphylaxie hat. Es finden Untersuchungen mit Kaninchenantisera gegen Antigene unterschiedlicher Molekülgrösse statt.

II. Methodik

- 1) Die passive cutane Anaphylaxie beruht auf folgendem Prinzip:
Man injiziert in die Haut eines Tieres eine bestimmte Menge eines Antiserums. Als Versuchstiere verwendet man für diese Reaktion im allgemeinen Meerschweinchen, da die Haut dieser Tiere gegenüber dieser Reaktion eine ausserordentliche Empfindlichkeit zeigt. Mit Ratten und Mäusen lässt sich zwar ebenfalls eine passive cutane Anaphylaxie hervorrufen, doch benötigt man bei diesen Tieren etwa 200 mal mehr Antikörperstickstoff als bei Meerschweinchen. Mit Kaninchen lässt sich überhaupt keine Reaktion erreichen (Ovary und Bier). Nach einer bestimmten Zeit, in der die Antikörper an die Zellen der Haut fixiert werden, wird den Tieren das korrespondierende Antigen intravenös verabreicht. Da die Antikörper an der Injektionsstelle an das Gewebe fixiert worden sind, kann sich nach Zuführung des Antigens nur eine örtlich begrenzte Antigen - Antikörper - Reaktion abspielen. Durch die bei dieser Reaktion freiwerdenden gefässwirksamen Substanzen wird die Permeabilität der Kapillaren erhöht. Dies lässt sich besonders schön zeigen, wenn man zusammen mit dem Antigen einen Farbstoff injiziert. Der Farbstoff tritt selektiv an der Hautstelle aus dem Gefäss-System heraus, an welcher die Antigen - Antikörper - Reaktion ablief, und bedingt eine intensive Verfärbung der Haut. Schon 1928 wies S.G. Ramsdell darauf hin, dass sich eine Antigen - Antikörper - Reaktion in der Haut durch den Farbaustritt an dieser Stelle nachweisen lasse. Er benutzte bei seinen Versuchen Trypanblau. Inzwischen wurden noch zahlreiche andere Farbstoffe angegeben. Wir verwandten bei unseren Versuchen Evans-Blue.

Bei unseren Experimenten wurden nur Meerschweinchen mit weissem Fell benutzt, da bei diesen Tieren der Farbaustritt am leichtesten zu erkennen ist. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 330 bis 350 Gramm. Ohne Unterschied des Geschlechtes wurden männliche und weibliche Tiere verwandt. Zunächst wurden die Haare auf beiden Seiten des Rückens mit einem Elektrohaarschneideapparat abge-

schnitten. Nachdem auf diese Weise der grösste Teil der Haare entfernt worden war, wurde die Rückenhaut mit einer Haarentfernungscreme eingerieben. Diese Creme verblieb etwa zehn Minuten auf der Haut und wurde dann unter lauwarmen Wasser abgewaschen. Auf diese Weise konnten die Haare vollständig entfernt werden. Ovary wies in seinen Arbeiten darauf hin, dass eine Haarentfernungscreme für die Haut einen Reiz bedeute, der Anlass zu unspezifischen Reaktionen geben könne. Um zu überprüfen, ob die von uns verwendete Haarentfernungscreme derartige unspezifische Reaktionen hervorrufe, wurde eine Reihe von Kontrollversuchen angestellt. Die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen unterschieden sich jedoch in keiner Weise von denen der Versuche, bei welchen die Haarentfernungscreme angewendet worden war. So konnten wir sicher sein, dass unsere Ergebnisse nicht durch unspezifische Reaktionen verfälscht wurden.

Nachdem die Meerschweinchen in der oben beschriebenen Weise vorbereitet waren, wurde ihnen in die Haut der einen Rückenseite 0,1 ml normales Kaninchen Serum und in die Haut der anderen Seite die gleiche Menge Kaninchen-Antiserum injiziert. Bei allen Manipulationen an den Tieren, besonders aber bei der intracutanen Injektion wurde streng darauf geachtet, dass die Haut der Tiere in keiner Weise verletzt oder gequetscht wurde; solche Schädigungen der Haut sind imstande, unspezifische Reaktionen zu provozieren. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden dann 0,5 ml des korrespondierenden Antigens zusammen mit 0,8 ml Evans - Blue in eine interdigitale Vene injiziert.

Folgende Antisera fanden bei unseren Versuchen Verwendung:

- a. Kaninchen - anti - Menschen Serum
- b. Kaninchen - anti - Menschen - α - β -Globulinserum
- c. Kaninchen - anti - Menschen - γ -Globulinserum.

- 2) Das Kaninchen - anti - Menschen - Serum wurde gewonnen, indem drei Kaninchen sechs Wochen lang zweimal wöchentlich je 5 ml Humanserum intraperitoneal injiziert wurden. Nach dieser Zeit wurden die Tiere

ausgeblutet und die Blutzellen abzentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, in Reagenzgläser gebracht und eingefroren. Untersuchungen mit der Immunelektrophorese ergaben, dass dieses Antiserum keine Antikörper gegen γ -Globuline enthielt.

Das Kaninchen - anti - Menschen - α - β -Globulinserum wurde folgendermassen hergestellt: Aus dem Kaninchen - anti - Menschen - Serum wurden die Antialbumine mit der 20 % Humanalbuminlösung der Behringwerke herausgefällt. Zu 1 ml des Kaninchen - anti - Menschen - Serums wurden 0,02 ml Humanalbuminlösung hinzugesetzt. Dieses Gemisch wurde kräftig geschüttelt und dann für zwei Stunden in ein Wasserbad von 37° Celsius gestellt. Danach verblieb es 24 Stunden lang im Kühlschrank bei vier Grad Celsius. Nach dieser Zeit wurde das Antiserum scharf abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Überstand, das von Antialbuminen befreite Kaninchen - anti - Menschen - Serum, bildete das Kaninchen - anti - Menschen - α - β -Globulinserum.

Als Kaninchen - anti - Menschen - γ -Globulinserum verwendeten wir das Kaninchen - anti - Menschen - γ -Globulinserum der Behringwerke.

Der Antikörpergehalt und der Antikörpertiter der Antisera wurde mit Hilfe der Immunelektrophorese bestimmt.

- 3) Bei der Immunelektrophorese handelt es sich im Prinzip um die elektrische Auftrennung von Proteingemischen im Agarmilieu und die Zugabe eines spezifischen Antiserums. Das zu trennende Proteingemisch wird im Agar- Gel der Elektrophorese unterworfen. Nachdem die Eiweissfraktionen aufgetrennt sind, wird in eine Vertiefung des Agargels, die längs der Wanderungsrichtung der Proteine verläuft, das entsprechende Antiserum gegeben. Dieses diffundiert allmählich seitlich zu den Proteinfractionen. An den Stellen, an welchen die Antikörper auf ein entsprechendes Antigen stossen, kommt es zu einer Antigen - Antikörper - Reaktion, und der Antigen - Antikörper - Komplex fällt in Form eines Präzipitates aus. Im Agargel bilden sich

an diesen Stellen leicht gekrümmte Präzipitationslinien. Unsere Untersuchungen wurden mit der von Grabar und Wunderly angegebenen Methode vorgenommen.

Herstellung des Agar-Gels. In ein Becherglas werden 4,5 g Agar eingewogen und 30 ml destilliertes Wasser hinzugegeben. Das Becherglas wird in ein kochendes Wasserbad gestellt, darauf werden nach und nach im Laufe von 30 Minuten 270 ml Veronalnatrium-Puffer dazugegossen. Wenn das Agar-Sol völlig homogen ist, filtriert man durch ein Nylonfiltertuch. Auf diese Weise erhält man ein Agar-Sol von 1,5 %. Dieses verteilt man gleichmässig auf trockene Reagenzgläser. Das Sol geht beim Erkalten in den Gelzustand über. Die Gläser werden verschlossen und in einem dunklen und kühlen Raum aufbewahrt.

Herstellung des Puffers. Für den Puffer werden 29,34 g diäthylbarbitursaures Natrium und 19,42 g Natriumazetat in 1 000 ml destilliertem Wasser gelöst und 180 ml 0,1 normale Salzsäure hinzugefügt. Diese Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 3 000 ml aufgefüllt. So erhält man einen Puffer mit einem pH von 8,6 und einer Ionenstärke von 0,1.

Zur Herstellung der Agarplatten benutzt man Objektträger von 76 x 26 mm Grösse. Die Objektträger werden zuerst mit 96 % Alkohol entfettet und danach auf einer heissen Platte vorgewärmt. Von dem im kochenden Wasserbad stehenden Agar werden 3 ml auf den horizontal liegenden Objektträger gegossen. Wenn der Agar auf den Objektträgern erstarrt ist, werden in die obere Hälfte der Agarplatte zwei nebeneinander liegende Löcher in den Agar gestanzt. In diese Löcher wird das Antigen eingefüllt. Der Objektträger wird mit seinen beiden schmalen Seiten auf je eine Plastikwanne gelegt. Letztere enthalten jeweils einen Platindraht als Elektrode. In die Wannen wird Pufferlösung gegossen, und die Agarplatten werden mittels Filterpapierstreifen mit der Pufferflüssigkeit verbunden. Die Eiweisskörper des Antigens lassen sich dann dadurch auftrennen, dass man 105 Minuten lang einen Gleichstrom von 100 Volt durch die Platten

fließen lässt. Nach dieser Zeit wird der Strom abgeschaltet und in den Agar eine längliche Rinne geschnitten, die parallel zur elektrophoretischen Wanderungsrichtung zwischen den beiden eingestanzten Löchern verläuft. In diese Rille wird das Antiserum eingefüllt. Danach werden die Agarplatten, um sie vor der Austrocknung zu schützen, in eine feuchte Kammer gelegt. Im Laufe von 48 Stunden diffundiert das Antiserum senkrecht zur Wanderungsrichtung der Eiweisskörper des Antigens in den Agar. In gleicher Weise diffundieren auch die Proteine von den Stellen aus, wohin sie durch den elektrischen Strom transportiert wurden. Es kommt zu der oben erwähnten Antigen - Antikörper - Reaktion und der Bildung der Präzipitatbänder.

In die in der beschriebenen Weise hergestellten Agarplatten füllten wir 0,01 ml Humanserum ein. Die Platten wurden der Elektrophorese unterworfen. Danach wurden in die Rille der Platten 0,05 ml unserer verschiedenen Antisera eingefüllt. Für die einzelnen Antisera konnte folgender Antikörpergehalt festgelegt werden: Das Kaninchen - anti - Menschen - Serum zeigte Präzipitationsbanden im Albumin - α -Globulin- und β -Globulinbereich. Im γ -Globulinbereich war keine Präzipitationslinie nachzuweisen. Dieses Antiserum enthielt demnach Antialbumine, Anti- α -Globuline und Anti- β -Globuline, aber keine Anti- γ -Globuline. Bei dem Kaninchen - anti - Menschen - α - β -Globulinserum waren lediglich im α - und β -Globulinbereich Präzipitationsbanden zu sehen. Das Antiserum enthielt also nur Anti - α - Globuline und Anti - β - Globuline. Das Kaninchen - anti - Menschen - γ - Globulinserum ergab nur die für die Anti - γ - Globuline charakteristische langgestreckte Präzipitationsbande, die von den Löchern, in die das Antigen eingefüllt wird, bis fast zum kathodischen Ende des Objektträgers verläuft.

In einer zweiten Versuchsserie wurde in die Löcher der Agarplatten als Antigen 0,01 ml Humanalbuminlösung (20 %) der Behringwerke eingefüllt. Bei dieser Versuchsanordnung konnten nur mit dem Kanin-

chen - anti - Menschenserum zwei Präzipitationsbanden im Albuminbereich erzielt werden. Die beiden anderen Antisera ergaben keinerlei Präzipitationen, ein Beweis dafür, dass das Kaninchen - anti - Menschen - α - β - Globulinserum sicher keine Antialbumine enthielt.

Um den Präzipitationstiter der einzelnen Antisera festzustellen, wurden die Agarplatten mit verschiedenen Verdünnungen des Antigens beschickt. Für das Kaninchen - anti - Menschenserum konnte gegen Albumine ein Antikörpertiter von 1 : 1 000 und gegen α - Globuline und β - Globuline ein Titer von 1 : 400 ermittelt werden.

Das Kaninchen - anti - Menschen - α - β - Globulinserum hatte im α - und β -Globulinbereich ebenfalls einen Antikörpertiter von 1 : 400. Der Antikörpertiter des Kaninchen - anti - Menschen - γ - Globulinserums betrug 1 : 600.

III. Ergebnisse der Untersuchungen

- 1) Nachdem die Meerschweinchen das Antiserum erhalten hatten, wurde zunächst der günstigste Zeitpunkt für die Antigeninjektion ermittelt. Das Antigen wurde den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Antikörperinjektion verabreicht. Da nur unverdünntes Antiserum Verwendung fand, erfolgte die Antigengabe frühestens sechs Stunden nach der Antikörperinjektion; Ovary weist nämlich darauf hin, dass durch die Injektion von unverdünntem Serum an der betreffenden Hautstelle Histamin frei wird. Dadurch wird die Permeabilität der Gefäße erhöht, und die Gefäße werden für den verwendeten Farbstoff durchlässig. Diese Histaminabgabe soll aber höchstens sechs Stunden anhalten, so dass die nach dieser Zeit erhaltenen Ergebnisse nicht auf einer unspezifischen Histaminabgabe beruhen. Injizierten wir also nach dieser Zeitspanne das Antigen zusammen mit Evans-Blue, so trat zwar die Antigen - Antikörper - Reaktion ein, die daran zu erkennen war, dass der betreffende Hautbezirk sich blau verfärbte. Doch war der Eintritt der Reaktion sehr zögernd. Wurde das Antigen nach einem längeren Zeitintervall injiziert, so trat die Reaktion schneller und intensiver ein. Die besten Ergebnisse erhielten wir nach einem Zeitraum von 22 bis 24 Stunden. Wurde das Antigen noch später injiziert, dann wurden die Reaktionen fraglich. Die Empfindlichkeit und Intensität der Reaktion verläuft also in Form einer Kurve, die langsam ansteigt, ihr Maximum nach 22 bis 24 Stunden erreicht und dann steil abfällt. Wir injizierten in allen weiteren Versuchen das Antigen 22 bis 24 Stunden nach der Antikörperinjektion. Bei den Untersuchungen zur Spezifität der Reaktion wurde 0,1 ml gewöhnliches Kaninchenserum intracutan verabreicht. 22 Stunden später erfolgte dann die Injektion von 0,5 ml Humanserum mit 0,8 ml Evans-Blue. Nur bei einem von zwanzig Tieren trat eine prompte Hautreaktion ein, nachdem das Humanserum unverdünnt intravenös injiziert wurde. Die übrigen neunzehn Tiere zeigten keinerlei Reaktion. Mit verdünntem Humanserum wurde nie eine positive Reaktion beobachtet. In allen späteren Versuchen wurde den

Meerschweinchen in die eine Rückenseite das Antiserum und in die andere Seite ein unverdünntes Normalserum als Kontrolle injiziert, um auf diese Weise unspezifische Reaktionen auszuschalten.

- 2) Der Einfluss der Molekülgrösse des Antigens auf die Empfindlichkeit der passiven cutanen Anaphylaxie wurde in der Weise geprüft, dass unsere verschiedenen Antisera intracutan injiziert wurden. Als erstes Antiserum verabreichten wir 0,1 ml Kaninchen - anti - Menschenserum intracutan und als Antigen Humanserum. Wie schon oben beschrieben, war der Antialbumintiter des Kaninchen - anti - Menschensserums 2,5 mal höher als der Antiglobulintiter. Man kann daher dieses Antiserum in der Hauptsache als Antialbuminserum betrachten, zumal wenn man als Antigen Humanalbumin verwendet, wie dies in einer zweiten Versuchsserie geschah. Das Antigen wurde 22 Stunden später in verschiedenen Verdünnungen zusammen mit Evans-Blue intravenös injiziert. Wir verwendeten Verdünnungen des Humanserums von 1 : 10 bis 1 : 10 000 000. Das Humanserum wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Ergebnisse auf der Haut der Tiere wurden einheitlich nach 15 Minuten abgelesen. Verdünnungen bis 1 : 1 000 000 ergaben eine eindeutige Verfärbung der Haut an der Stelle der Antikörperinjektion (Tabelle 1). Die passive cutane Anaphylaxie beim Meerschweinchen ist also so empfindlich, dass man mit dem System Kaninchen - anti - Humanalbuminserum - Humanserum die Antigen - Antikörper - Reaktion selbst dann noch nachweisen kann, wenn man nur 0,02% Antigen injiziert.

In einer zweiten Versuchsserie verwandten wir als Antigen eine 5 % Humanalbuminlösung ebenfalls in Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 10 000 000. Wiederum war eine positive Antigen - Antikörper - Reaktion bis zu einer Antigenverdünnung von 1 : 1 000 000, entsprechend 0,025 gamma Antigen nachzuweisen (siehe Tabelle 2).

- 3) Als nächstes Antiserum wurde Kaninchen - anti - Menschen - α - β -Globulinserum intracutan injiziert. Als Antigene verwandten wir

wiederum einmal Humanserum und zum anderen Humanalbumin. Beide Antigene wurden in Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 1 000 000 verwendet. Injizierten wir als Antigen Humanserum, so war eine positive Reaktion bis zu 1 : 1 000 nachzuweisen. In diesem Fall mußten also mindestens 11 gamma Antigen verabreicht werden (Tabelle 3). Mit Humanalbumin als Antigen entwickelte sich überhaupt keine Reaktion.

- 4) Als drittes Antiserum wurde den Meerschweinchen das Kaninchen - anti - Menschen - γ - Globulinserum intracutan injiziert. Als Antigen benutzten wir wieder Humanserum und Humanalbumin in Verdünnungen von 1 : 10 bis 1 : 1 000 000. Bei dieser Versuchsanordnung konnte das Humanserum nur bis 1 : 100, entsprechend 44 gamma Antigen, verdünnt werden, um eine positive Reaktion zu erzielen (Tabelle 4). Mit Humanalbumin erzielte man auch hier wiederum keine positive Reaktion.
- 5) Einfluss von Antihistaminica auf die passive cutane Anaphylaxie: Hier wurde den Meerschweinchen Luvistin und Periactin eine halbe Stunde vor Auslösung der Antigen - Antikörper - Reaktion intramuskulär oder intraperitoneal injiziert. Bei diesen Substanzen handelt es sich chemisch einmal um Pyrrolidyl - aethyl - phenyl - benzyl - amin und zum anderen um 1-Methyl-4- (5-dibenzo-[a,e] - cycloheptatrienyliden) - piperidin Monohydrat. Als Antiserum fand bei dieser Versuchsanordnung nur Kaninchen - anti - Humanalbumin - serum und als Antigen eine 5 % Humanalbuminlösung Verwendung. Injizierte man vor der Antigeninjektion 15 mg Luvistin/kg Körpergewicht, so waren mindestens 250 gamma Antigen notwendig, um eine passive cutane Anaphylaxie hervorzurufen. Luvistin zeigt also eine deutliche Hemmung der Reaktion (Tabelle 5).

Die Meerschweinchen, die Periactin vor der Antigengabe erhielten, wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt 0,2 mg Periactin/kg Körpergewicht, die zweite Gruppe 2,0 mg/kg Körperge-

wicht. Die Injektion erfolgte intraperitoneal jeweils 30 Minuten vor der Antigengabe. Bei den Tieren der ersten Gruppe mussten mindestens 25 gamma Antigen verabreicht werden, um eine positive Reaktion zu erhalten (Tabelle 6 a). Bei den Tieren der zweiten Gruppe waren dazu mindestens 250 gamma Antigen notwendig (Tabelle 6 b). So hatte also auch Periactin einen deutlich hemmenden Einfluss auf die passive cutane Anaphylaxie-Reaktion.

- 6) Einfluss von Antiserotoninen auf die passive cutane Anaphylaxie-Reaktion: Hier wurde Meerschweinchen 30 Minuten vor der Antigeninjektion 0,25 mg Lysergsäurediäthylamid intraperitoneal verabreicht. Bei dieser Versuchsanordnung konnte keinerlei hemmender Einfluss auf die passive cutane Anaphylaxie festgestellt werden (Tabelle 7).

IV. Besprechung der Ergebnisse

Wie aus unseren Versuchen hervorgeht, stellt die passive cutane Anaphylaxie-Reaktion eine besonders empfindliche Methode dar, um eine Antigen - Antikörper - Reaktion nachzuweisen. Zwischen der intrakutanen Antikörperinjektion und der intravenösen Antigenverabfolgung muss eine bestimmte Latenzperiode verstreichen, ehe eine cutane anaphylaktische Reaktion entstehen kann. Diese Latenzperiode deutet darauf hin, dass es sich bei der passiven cutanen Anaphylaxie um eine lokale Gewebsreaktion handelt, bei der die zirkulierenden Antikörper keine Rolle spielen. Vielmehr müssen während der Latenzperiode die Antikörper an die Zellen des Gewebes fixiert werden. Für diese Auffassung sprechen auch die Untersuchungen von Ovary, bei denen die Antisera intravenös und die entsprechenden Antigene intracutan verabreicht wurden. Auch bei dieser Modifikation der passiven cutanen Anaphylaxie erhält man erst nach einer bestimmten Latenzperiode positive Ergebnisse. Die Latenzperiode hängt von verschiedenen Faktoren ab. Wie Ovary, Benacerraf und Kabat zeigten, ist sie umgekehrt proportional der Menge der injizierten Antikörper. Dass jede Schädigung der Haut, durch die Histamin freigesetzt wird, die Latenzperiode beeinflusst, zeigten Benacerraf, Biozzi und Halpern. Sie konnten durch Injektion kleiner Mengen Histamin die Latenzperiode ganz erheblich verkürzen. Da bei unseren Experimenten gleich grosse Mengen Antiserum intracutan injiziert wurden, hielten wir konstant eine Latenzperiode von 22 bis 24 Stunden ein. Mit dieser Anordnung erhielten wir die besten Ergebnisse.

Wie lassen sich nun die Empfindlichkeitsunterschiede der passiven cutanen Anaphylaxie bei Verwendung verschiedener Antisera erklären? Die Untersuchungen von Ovary haben bewiesen, dass nicht alle Antisera in der Lage sind, eine passive cutane Anaphylaxie hervorzurufen. So gelingt es weder mit Ziegenantisera noch mit Pferdeantisera eine positive Reaktion zu erzielen. Biozzi, Halpern und Binaghi

führen diese Tatsache auf die Grösse der Pferde- und Ziegengammaglobuline zurück. Sie glauben, dass diese nicht an die Zellen des Gewebes fixiert werden können.

Dass auch die Art des Antigens bei der passiven cutanen Anaphylaxie eine Rolle spielt, zeigen die Untersuchungen von Bier und Siqueira mit der passiven umgekehrten Anaphylaxie. Sie injizierten bei diesen Versuchen zunächst das Antigen intracutan und nach einer bestimmten Latenzperiode das Antiserum intravenös. Während ihnen mit Meerschweinchen-anti-Kaninchen- γ -Globulinserum eine positive Reaktion gelang, war dies mit Meerschweinchen-anti-Rinder- γ -Globulinserum und Meerschweinchen-anti-Ziegen- γ -Globulinserum und ihren entsprechenden Antigenen nicht möglich. Da es sich bei allen drei Antigenen um γ -Globuline handelt mit gleicher Molekülgrösse, glauben die Autoren, dass zwischen der Grösse des Antigenmoleküls und der Empfindlichkeit der passiven cutanen Anaphylaxie kein Zusammenhang besteht. Die unterschiedlichen Ergebnisse werden vielmehr auf artspezifische Unterschiede mit ungleich starker Fixationsfähigkeit der einzelnen Antigene durch das Gewebe zurückgeführt. Die passive cutane Anaphylaxie, die als lokale Gewebsreaktion aber nur mit fixierten Antikörpern und Antigenen stattfinden kann, wird bei mangelnder Fixationsfähigkeit keine positiven Resultate bringen.

In unseren Experimenten fanden nur Kaninchenantisera Verwendung, die sich gegen verschiedene menschliche Eiweisskörper richteten. Die Antikörper waren in diesem Fall immer Kaninchen- γ -Globuline, die sich, wie dies oben dargelegt worden ist, durch physikalische oder chemische Methoden von "normalen" Globulinen nicht unterscheiden lassen. Durch die Antikörper kann man also den Empfindlichkeitsunterschied in den dargestellten Untersuchungen nicht erklären, da es sich ja immer um Kaninchen- γ -Globuline handelt. Auch die Präzipitationstiter der einzelnen Antisera waren nicht wesentlich voneinander verschieden, so dass damit die unterschiedlichen Ergebnisse nicht erklärbar sind. Der Präzipitationstiter des Kaninchen-anti-

Menschenalbuminserums betrug 1 : 1 000, der des Kaninchen-anti-Menschen- α - β -Globulinserums 1 : 400 und der des Kaninchen-anti-Menschen- γ -Globulinserums 1 : 600. Mit der passiven cutanen Anaphylaxie wurden aber mit dem Kaninchen-anti-Menschenalbuminserum noch 0,02 gamma Antigen nachgewiesen. Mit dem Kaninchen-anti-Menschen- α - β -Globulinserum wurden dagegen nur noch mit 11 gamma Antigen positive Reaktionen beobachtet, und die kleinste nachgewiesene γ -Globulinmenge betrug 44 gamma. Somit unterschieden sich die Präzipitationstiter in der Immunoelektrophorese nicht einmal um eine Zehnerpotenz, in der passiven cutanen Anaphylaxie dagegen erstreckten sich die Empfindlichkeitsunterschiede über drei Zehnerpotenzen.

Betrachtet man nun die einzelnen Antigene, so stellt man fest, dass es sich in jedem Fall um menschliche Proteine handelt. Sie weisen als Verschiedenheit eine unterschiedliche Molekülgrösse auf. So richtet sich das Antialbuminserum gegen einen Eiweisskörper mit einer Grösse von 69 000, das Kaninchen-anti-Menschen- α - β -Globulinserum gegen einen Eiweisskörper mit einem Molekulargewicht von 90 000 und das Kaninchen-anti-Menschen- γ -Globulinserum gegen einen Eiweisskörper mit einem Molekulargewicht von 156 000. Auf Grund dieser Ergebnisse müssen wir also annehmen, dass die Empfindlichkeit der passiven cutanen Anaphylaxie von der Molekülgrösse des Antigens beeinflusst wird. Die Empfindlichkeit der Reaktion nimmt mit steigender Molekülgrösse erheblich ab. Somit scheinen nicht nur artspezifische Unterschiede bei Antikörpern (Ovary) und Antigenen (Bier und Siqueira) in der Fähigkeit zur Fixation durch das Gewebe zu bestehen, sondern die Empfindlichkeit der passiven cutanen Anaphylaxie wird auch entgegen der Meinung anderer Autoren (Bier und Siqueira) durch die Molekülgrösse des Antigens bestimmt. Diese Annahme wird auch durch die schnellere Diffusion von Albumin mit einer Halbwertszeit von 1,1 Tagen gestützt. Im Gegensatz dazu hat das γ -Globulin eine Halbwertszeit von 2,2 Tagen (Ditschuneit und Mitarbeiter). Der Einfluss anderer Eigenschaften der von uns verwendeten Proteine, z.B. Unterschiede

in der Aminosäurezusammensetzung und endständiger Gruppen muss jedoch ebenfalls diskutiert werden.

Über die Substanzen, die bei einer Antigen - Antikörper - Reaktion freigesetzt werden, herrscht bis heute noch keine endgültige Klarheit. Bartosch, Feldberg und Nagel konnten, wie oben bereits dargestellt worden ist, mit ihren Untersuchungen wahrscheinlich machen, dass die Folgen einer anaphylaktischen Reaktion durch die Freisetzung von Histamin verursacht werden. Viele andere Untersucher konnten diesen Befund bestätigen, so besonders Katz, Schachter, Mongar und Schild und Miles und Miles. Auch unsere eigenen Befunde deuten darauf hin, dass Histamin in die anaphylaktischen Reaktionen eingeschaltet ist. So gelang es uns mit Antihistaminica die Empfindlichkeit der passiven cutanen Anaphylaxie bei Meerschweinchen weitgehend herabzusetzen. An Stelle von 0,025 gamma Antigen mussten 25 bzw. 250 gamma Antigen, das Tausend- bis Zehntausendfache, injiziert werden, um eine positive Reaktion zu erhalten. Auch Ovary konnte die Empfindlichkeit der passiven cutanen Anaphylaxie mit Antihistaminica stark vermindern.

Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Brocklehurst, Humphrey und Perry, die weder das Arthus-Phänomen noch die passive cutane Anaphylaxie mit Antihistaminica beeinflussen konnten. Sie unternahmen ihre Untersuchungen jedoch an Ratten, bei denen anscheinend eine andere Substanz als Histamin bei den Antigen - Antikörper - Reaktionen eine Rolle spielt. Die Untersuchungsbefunde von Benditt und Rowley, Humphrey und Jaques und Gaddum, Peart und Vogt zeigen, dass bei anaphylaktischen Reaktionen neben Histamin auch Serotonin freigesetzt wird. Und wahrscheinlich sind die Folgen der Antigen - Antikörper - Reaktion bei der Ratte dem Serotonin zuzuschreiben. Diese Vermutung wird durch die Arbeiten von Gaddum, Peart und Vogt und Benditt und Rowley bestätigt.

Bei Meerschweinchen dagegen scheint das Serotonin bei der Antigen -

Antikörper - Reaktion keine ausschlaggebende Bedeutung zu besitzen. So war es uns nicht möglich, mit Lysergsäurediäthylamid, einem der spezifischsten Antiserotonine, die passive cutane Anaphylaxie bei Meerschweinchen in irgendeiner Weise zu beeinflussen. Auf Grund der verschiedenen Ergebnisse erscheint es möglich, dass Histamin vorwiegend bei der einen Spezies, dem Meerschweinchen, für die biochemischen Folgen der Antigen - Antikörper - Reaktion verantwortlich ist, während das Serotonin bei anderen Spezies, den Ratten, die ausschlaggebende Rolle spielt.

Es ist jedoch sehr schwierig, hier die Ergebnisse von Inderbitzin und Dobrić einzuordnen. Sie konnten bei der Ratte mit der passiven cutanen Anaphylaxie am Ort der Reaktion eine Histaminanhäufung nachweisen. Gleichzeitig fanden sie aber auch in einem Kontrollfeld, das nicht an der anaphylaktischen Reaktion teilnahm, eine Histaminhäufung, die parallel der Histaminvermehrung im Reaktionsfeld war. Sie schliessen daraus, dass die Freisetzung von Histamin nicht für die Symptome der anaphylaktischen Reaktion verantwortlich sein kann. Hier müssen weitere Untersuchungen klären, ob nicht noch andere biologische Substanzen für die Folgen der cutanen anaphylaktischen Reaktionen verantwortlich sind.

Zusammenfassung

Es wurden quantitative Untersuchungen zum Nachweis von Antigen - Antikörper - Reaktionen mit der passiven cutanen Anaphylaxie am Meerschweinchen durchgeführt, und ihre Beeinflussung mit Histamin- und Serotoninhemmern geprüft. Als Antisera wurden Kaninchen - anti - Menschen - Albumin-, Kaninchen - anti - Menschen - γ - β -Globulin- und Kaninchen - anti - Menschen - γ - Globulinsera verwendet. Zur Untersuchung kamen insgesamt 419 Tiere.

Es zeigte sich, dass die Empfindlichkeit der passiven cutanen anaphylaktischen Reaktion von der Molekülgrösse des Antigens wesentlich beeinflusst wird. So lassen sich mit dem Antialbuminserum 0,025 gamma Albumin, mit dem Anti- α - β -Globulinserum eine Antigenmenge von 11 gamma und mit dem Anti- γ -Globulinserum nur noch 44 gamma Antigen nachweisen. Die Präzipitationstiter der verschiedenen Antisera in der Immunoelktrophorese unterschieden sich dagegen nur unwesentlich voneinander. Die Wirkung von Antihistaminika (Periaktin und Luvistin) und einem Serotoninhemmer (Lysergsäurediäthylamid) mit Humanalbumin als Antigen und einem Kaninchen - anti - Albuminserum wurde an 235 Tieren geprüft. Es zeigte sich dabei, dass mit Anthihistaminica die Empfindlichkeit der anaphylaktischen Hautreaktion stark herabgesetzt werden kann. Nach Verabreichung von Antihistaminica ist die tausend- bis zehntausendfache Antigenmenge zur Auslösung einer positiven Reaktion notwendig. Mit dem Serotoninhemmer ist die Empfindlichkeit der Reaktion nicht zu beeinflussen.

Tabelle Nr. 1

Antigen: Humanserum

Antikörper: Kaninchen - anti - Menschenserum

Antigen- verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktion nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	5	5	20 000,0
1 : 10	5	5	2 000,0
1 : 100	10	10	200,0
1 : 1 000	10	10	20,0
1 : 10 000	20	19	2,0
1 : 100 000	25	25	0,2
1 : 1 000 000	25	25	0,02
1 : 10 000 000	10	0	0,002

Tabelle Nr. 2

Antigen: Humanaalbumin 5 %

Antikörper: Kaninchen - anti - Menschenserum

Antigen- verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktionen nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	5	5	25 000,0
1 : 10	5	5	2 500,0
1 : 100	15	15	250,0
1 : 1 000	18	18	25,0
1 : 10 000	20	19	2,5
1 : 100 000	25	23	0,25
1 : 1 000 000	25	24	0,025
1 : 10 000 000	10	0	0,0025

Tabelle Nr. 3

Antigen: Humanserum

Antikörper: Kaninchen - anti - Menschen - α - β - Globulinserum

Antigen- Verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktionen nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	5	5	11 000,0
1 : 10	7	7	1.100,0
1 : 100	11	11	110,0
1 : 1 000	25	24	11,0
1 : 10 000	25	0	1,1
1 : 100 000	10	0	0,11
1 : 1 000 000	10	0	0,011

Tabelle Nr. 4

Antigen: Humanserum

Antikörper: Kaninchen - anti - Menschen - γ - Globulinserum

Antigen- verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktionen nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	5	5	4 400,0
1 : 10	15	15	440,0
1 : 100	25	25	44,0
1 : 1 000	25	0	4,4
1 : 10 000	10	0	0,44
1 : 100 000	8	0	0,044
1 : 1 000 000	5	0	0,0044

Tabelle Nr. 5

Antigen: Humanalbumin 5 %

Antiserum: Kaninchen - anti - Menschenserum

Vor der Antigeninjektion wurden 15 mg Luvistin verabreicht

Antigen- verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktionen nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	8	8	25 000,0
1 : 10	10	10	2 500,0
1 : 100	25	25	250,0
1 : 1 000	25	0	25,0
1 : 10 000	15	0	2,5
1 : 100 000	10	0	0,25
1 : 1 000 000	5	0	0,025

Tabelle Nr. 6 a

Antigen: Humanalbumin 5 %

Antiserum: Kaninchen - anti - Menschenserum

30 Minuten vor der Antigeninjektion wurden 0,2 mg Periactin/kg Körpergewicht verabreicht

Antigen- verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktionen nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	2	2	25 000,0
1 : 10	2	2	2 500,0
1 : 100	4	4	250,0
1 : 1 000	10	10	25,0
1 : 10 000	10	0	2,5
1 : 100 000	5	0	0,25
1 : 1 000 000	5	0	0,025

Tabelle Nr. 6 b

Antigen: Humanalbumin 5 %

Antiserum: Kaninchen - anti - Menschenserum

30 Minuten vor der Antigeninjektion wurden 2,0 mg Periactin/kg Körpergewicht verabreicht

Antigen- verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktionen nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	2	2	25 000,0
1 : 10	2	2	2 500,0
1 : 100	5	5	250,0
1 : 1 000	10	0	25,0
1 : 10 000	5	0	2,5
1 : 100 000	5	0	0,25
1 : 1 000 000	5	0	0,025

Tabelle Nr. 7

Antigen: Humanalbumin

Antikörper: Kaninchen - anti - Menschenserum

Vor der Antigeninjektion wurden 0,25 mg Lysergsäurediäthylamid verabreicht

Antigen- verdünnung	Zahl der Tiere	Zahl der positiven Reaktionen nach 15'	Menge des Anti- gens in Gamma
1 : 1	5	5	25 000,0
1 : 10	5	5	2 500,0
1 : 100	5	5	250,0
1 : 1 000	8	8	25,0
1 : 10 000	10	10	2,5
1 : 100 000	16	15	0,25
1 : 1 000 000	16	15	0,025

- Arthus, M.: zitiert in R. Doerr: Immunitätsforschung, 4 - 8, 1949 - 1951.
- Bartosch, R., W. Feldberg und E. Nagel:
Das Freiwerden eines histaminähnlichen Stoffes bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens. Pflügers Archiv für Physiologie, 250, 129 (1932).
- Benacerraf, B. und E.A. Kabat:
A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. J. Immunol. 62, 517 (1949)
- Benacerraf, B., G. Biozzi und B.N. Halpern:
The effect of histamine upon local fixation of antibodies in the skin of guinea pig. J. Immunol. 73, 318 (1954).
- Benditt, E.P. und D.A. Rowley:
5-Hydroxytryptamin and histamine as mediators of vascular injury produced by agents which damage mastcells. J. Exp. Med. 103, 399 (1956).
- Bier, O.G. und M. Siqueira:
Passive reversed cutaneous anaphylaxis to protein antigens. Int. Arch. Allergy, 6, 391 (1955).
- Biozzi, G., B.N. Halpern und R. Binaghi:
Modalités de l'inhibition de la sensibilisation anaphylactique cutanée passive, chez le cobaye, par des globuline provenant de diverses espèces animales, in Immunopathology, I. International Symposium, Ed. P. Grabar und P. Miescher Basel/Stuttgart 1959, Benno Schwabe & Co., S. 243.
- Brocklehurst, W.E., J.H. Humphrey und W.L. Perry:
The Role of histamine in cutaneous antigen - antibody reactions in rat. J. Physiol., 129, 205 (1955).
- Code, C.F.:
The histamine content of blood of guinea pigs and dogs during anaphylactic shock. Am. J. Physiol 127, 71 (1939).
- Dale, H.H. und P.P. Laidlaw:
Further observations on the actions of β -Iminanzolyethylamine. J. Physiol. 43, 182 (1911).

Dale, H.H. und P.P. Laidlaw:

Histaminshock. J. Physiol. 52, 355 (1919).

Ditschuneit, H., H.J. Kapp und E.F. Pfeiffer:

Nachweis und klinische Bedeutung von Insulinantikörpern bei Insulinresistenz (im Druck).

Ditschuneit, H., R. Ohebschalon und E.F. Pfeiffer:

Studien zur "Übertragung" der Masuginéphritis der Ratte. 5. Die Kinetik der Elimination von Kaninchen-anti-Rattennierenglobulin, Kaninchen- γ -Globulin, Humanalbumin und Human- γ -Globulin bei der Ratte.
Zeitschrift ges. Exper. Med. 134, 148 (1961).

Doerr, R.:

Immunitätsforschung, 4 - 8, 1949 - 1958.

Dragstedt, C.A. und E. Gebauer - Fuesnegg.

Studies in anaphylaxis. I. The appearance of physiological active substance. Am. J. Physiol. 102, 512 (1932).

Fisher, J.P. und R.A. Cooke:

Passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig, an immunologic and pathologic study. J. Allergy, 28, 2 (1957).

Fisher, J.P., E. Middleton und A.E.O. Menzel:

Study on passive cutaneous anaphylaxis with serum of allergic patients. J. Allergy, 27 (3), 256 (1956).

Friedemann, U.:

Über passive Überempfindlichkeit.
Münch. Med. Wschr. 54, 2414 (1907).

Gaddum, J.H., W.S. Peart und M. Vogt:

zitiert in P. Holtz: Über den gegenwärtigen Stand der Serotoninforschung. Dtsch. med. Wschr. 82, 681 (1958).

Gay, F.P. und E.E. Southard:

zitiert in R. Doerr: Immunitätsforschung, 4 - 8, 1949 - 1951.

Grabar, P.:

Die Immunoелеktrophorese: Untersuchungen normaler und pathologischer Komponenten des Blutes. Triangel, IV (5), 185 (1960).

Grabar, P. in Miescher, P. und K.O. Vorlaender:

Immunopathologie in Klinik und Forschung,
1 - 63. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1957.

Hansen, K.:

in H. Dennig: Lehrbuch der Inneren Medizin,
Band II, 651 - 697. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1957.

Humphrey, J.H. und R. Jaques:

The release of histamine and 5-hydroxytryptamin
(serotonin) from platelets by antigen - antibody
reactions (in vitro). J. Physiol. 128, 9 (1955).

Inderbitzin, Th.

und V. Dobric: Histamine in the skin anaphylaxis.
Int. Arch. Allergy, 14, 325 (1959).

Katz, G.:

Histamine release from blood cells in anaphylaxis
in vitro. Science, 91, 221 (1940).

Miles, A.A. und E.M. Miles:

Vascular reactions to histamine, histamin-
eliberator and leukotaxin in the skin of guinea
pigs. J. Physiol. 118, 228 (1952).

Mongar, J.L. und H.O. Schild:

Parallelism between the effects of anaphylactic
shock and of a synthetic histamine releaser.
J. Physiol. Lond. 116, 31 (1952).

Mongar, J.L. und H.O. Schild:

Comparison of effects of anaphylactic shock and
of chemical histamine releasers. J. Physiol. 118,
461 (1952).

Mosebach, K.O.:

Allergie und Gewebshormone. Med. Welt,
46, 2381 (1961).

Nicolle, M.:

zitiert in R. Doerr: Immunitätsforschung,
4 - 8, 1949 - 1951.

Otto, R.:

Zur Frage der Serumüberempfindlichkeit.
Münch. Med. Wschr. 54, 1665 (1907).

Ovary, Z.:

Quantitative studies in passive cutaneous
anaphylaxis of guinea pig. Int. Arch. Allergy,
3, 162 (1952).

Ovary, Z.:

Immediate reactions in the skin of experimental
animals provoked by antigen - antibody interaction.
Prog. Allergy, 5, 459 (1958).

Ovary, Z.:

Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse.
I. Immunol. 81, 355 (1958).

- Ovary, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig. Degree of reaction as function of the quantity of antigen and antibody. *Int. Arch. Allergy*, 14, 18 (1959).
- Ovary, Z.: und O.G. Bier: Quantitative studies of Arthus reaction and of passive cutaneous anaphylaxis induced passively in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 81, 584 (1952).
- Ovary, Z.: und O.G. Bier: Quantitative studies on passive cutaneous anaphylaxis and its relationship to Arthus-phenomen. *J. Immunol.* 71, 6 (1953).
- Ovary, Z. und G. Biozzi: Passive sensitization of skin of guinea pig with human antibody. *Int. Arch. Allergy*, 5, 241 (1954).
- Ovary, Z., H. Randall, E. Witebsky, N.R. Rose, S. Shulman und R. Metzgar: Thyreoid-specific autoantibodies studied by passive cutaneous anaphylaxis of guinea pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. - N.M.* 99 (2), 394 (1958).
- Ramsdell, S.G.: The use of Trypan blue to demonstrate the immediate skin reaction in rabbits and guinea pigs. *J. Immunol.* 15, 305 (1928).
- Rapport, M.M.: Serum vasoconstrictor (serotonin); presence of creatinine in complex. Proposed structure of vasoconstrictor principle. *J. biol. Chem.* 180, 961 (1949).
- Richet: zitiert in R. Doerr: *Immunitätsforschung*. 4 - 8, 1949 - 1951.
- Riley, J.F. und G.B. West: The presence of histamine in tissue mastcells. *J. Physiol.* 120, 528 (1953).
- Rosenberg, L.T., M.H. Chandler und E.E. Fischel: Passive cutaneous anaphylaxis with antigen - antibody-complexes and additional antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 98, 451 (1958).
- Rosenberg, L.T., M.H. Chandler und E.E. Fischel: Quantitative studies of repeated cutaneous anaphylaxis at sites sensitized with a single injection of antibody. *J. Immunol.* 83, 264 (1959).

Sanyal, R.K. und G.B. West:

Binding of histamine in mammalian tissues.
Nature, 178, 1293 (1956).

Schachter, M.:

Anaphylaxis and histamine release in the
rabbit. Brit. J. Pharmacol. 8, 412 (1953).

Wunderly, Ch.:

Die Immunoelktrophorese in Agar-Gel.
Experimentia, XIII (11), 421 (1957).

Herrn Professor Dr. med. E. F. Pfeiffer, Oberarzt der
I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main,
möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des
Themas und die mir bei der Arbeit gewährte Unterstützung
danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. H. Ditschuneit,
I. Medizinische Universitätsklinik Frankfurt am Main, der
mich in die Technik der passiven cutanen Anaphylaxie und
der Immunoelktrophorese einführte und mir jederzeit mit
Rat und Tat zur Seite stand.

Lebenslauf

Am 15. November 1935 wurde ich als Sohn des Maurers Josef Kapp und seiner Ehefrau Johanna, geborene Kessler, in Essen geboren. Meine Einschulung erfolgte im Jahre 1942 in Essen.

Die ersten sieben Gymnasialjahre besuchte ich ein Internat.

Die Reifeprüfung legte ich am 7. März 1956 im Lessing-Gymnasium in Frankfurt am Main ab.

Im Sommersemester 1956 wurde ich als Studierender an der Medizinischen Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main aufgenommen. Die ärztliche Vorprüfung legte ich im Februar 1959 ab.

Am 30. Dezember 1960 schloss ich mit Helga Fischer die Ehe.

Das Staatsexamen habe ich am 26. Juli 1962 vor dem Prüfungsausschuß in Frankfurt am Main abgelegt.

Ehrenwörtliche Erklärung

.....

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Quantitative Untersuchungen zum Nachweis von
Antigen- Antikörpern- Reaktionen mit der
passiven cutanen Anaphylaxie und ihre Beein-
flussung mit Histamin- und Serotoninhemmern

in der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt/Main

unter Leitung von Prof. Dr. med. E.F. Pfeiffer

mit Unterstützung durch Dr. med. Hans Ditschuneit

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/Main. den 8.Mai 1963

Hermann J. Köpp

Meine akademischen Lehrer waren:

Anatomie: Prof. Dr. med. Starck

Histologie: Prof. Dr. med. Ortmann

Physiologie: Prof. Dr. med. Wezler

Physiologische Chemie: Prof. Dr. med. Felix

Hygiene: Prof. Dr. med. Herzberg

Pathologie: Prof. Dr. med. Sandritter

Pharmakologie: Prof. Dr. med. Holtz

Gynäkologie: Prof. Dr. med. Schwenzer

Medizinische Strahlenkunde: Prof. Dr. med. Rajewsky

Innere Medizin: Prof. Dr. med. Hoff.

Chirurgie: Prof. Dr. med. Geissendörfer

Neurologie und Psychiatrie: Prof. Dr. med. Zutt

Augenheilkunde: Prof. Dr. med. Thiel

Kinderheilkunde: Prof. Dr. med. de Rudder

Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde: Prof. Dr. med. Mittermaier

Gerichtliche Medizin: Prof. Dr. med. Wiethold

Haut- und Geschlechtskrankheiten: Priv. Doz. Dr. med. Landes

Orthopädie: Prof. Dr. med. Güntz

